



## ایجاد سویه مخمر حساس به تاکسول با القای جهش $TUB2-Asp^{26}$

حامد عشوریون<sup>۱</sup>، شمس الضحی ابوالمعالی<sup>۲\*</sup>، زیبا فولادوند<sup>۱</sup>، فاطمه رضاقلی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی. <sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان

### چکیده

**سابقه و هدف:** پاکلی تاکسل، یک ترکیب ضد میکروتوبولی موثر بر سرطان‌های ریه، تخمدان و سینه است. تولید کم این دارو در درخت سرخدار و نیز مقاومت به آن در مراحل شیمی درمانی، از عوامل محدودیت کاربردی پاکلی تاکسل هستند. هدف این پژوهش، ایجاد سیستم غربالگری برای پیدا کردن منابع جدید تولید تاکسول، با استفاده از سویه جهش‌یافته ساکارومیسیس سرویزیه حساس به تاکسول می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** برای ایجاد جهش در ژن  $TUB2$  کروموزوم مخمر، آغازگرهای حاوی تغییر در کدون ۲۶ از گلیسین به آسپارتیک اسید؛ (GGT به GAT) طراحی و با کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز در سه مرحله تکثیر ژن  $TUB2-Asp^{26}$  انجام گرفت. سپس ژن  $TUB2$  از سویه مخمر هاپلوئید در وکتور بیانی مخمری در پروموتور گالاکتوز همسانه‌سازی گردید. پس از تراریخت‌سازی مخمر هاپلوئید با سازه  $Gal-TUB2$ ، (pZF58)، برای بار دوم با محصول PCR از ژن  $TUB2-Asp^{26}$  و در محیط حاوی قند گالاکتوز تراریخت‌سازی و علیه  $40 \mu M$  تاکسول، غربالگری تراریخته‌ها انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در سویه مخمر YNHA1، حاصل از غربالگری ۸۴ تراریخته، مقدار MBC علیه تاکسول  $50 \mu M$  تعیین گردید. مخمری با نقص در ترابره‌های غشایی و  $TUB2$  که در محل اتصال تاکسول در آمینواسید مشابه بتاتوبولین مغز و تنها در آمینواسید ۲۶ مشابه مخمر بود، توانست  $25 \mu M$  تاکسول را تحمل کند. اما در پژوهش حاضر به دلیل استفاده از میزان مخمر که نقص در ترابره‌های غشایی نداشت، میزان تحمل تا ۲ برابر افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** این مخمر جهش‌یافته، می‌تواند برای پیدا کردن منابع جدید تولید‌کننده‌های تاکسول با توان تولید تا  $50 \mu M$ ، در غربالگری‌ها به کار رود.

**واژگان کلیدی:** پاکلی تاکسل، توبولین، ساکارومیسیس سرویزیه.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۷

### مقدمه

بسیار اندک تولید می‌شود (۲) و در مراحل شیمی درمانی، مقاومت تومورها به دارو بوجود می‌آید. راه حل موجود یعنی افزایش طول دوره درمان و نیز افزودن مکمل‌های حساس‌کننده تومور، نتایج رضایت‌بخشی را به همراه نداشتن است. از این رو کشف داروهای جدید با نقاط اثر مشابه تاکسول در درمان

پاکلی تاکسل با نام تجاری تاکسول یک عامل بازدارنده میتوز است که در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان و سینه کاربرد دارد (۱). این داروی بسیار گران‌قیمت در منابع طبیعی و به مقدار

(\* آدرس برای مکاتبه: سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۲۳۳۱۵۳۲۲۹۳ پست الکترونیک: s\_abdolmaali@semnan.ac.ir



موتان‌های مخمر نانوائی ۴۸۰۰ حذف غیر ضروری گزارش شده که می‌توانند به صورت هاپلوئید یا دیپلوئید وجود داشته باشند (۱۱ و ۱۲).

به دلیل وجود ترابرهای غشایی و نیز تفاوت در آمینواسیدهای امینه محل اتصال پاکلی تاکسل به زیر واحد بتاتولولین (در مخمر *TUB2*)، مخمر نسبت به این سم مقاوم است (۱۳). بنابراین برای ایجاد سویه جهش یافته از مخمر هاپلوئید که نسبت به تاکسول حساس باشد، تغییر در مولکول *TUB2*، هدف قرار گرفت. از بین ۵ آمینو اسید محل اتصال پاکلی تاکسل (۳) آمینو اسید ۲۶ به دلیل قرار گرفتن در انتهای امینی و نیز تاثیر در اتصال قوی تاکسول به زیر واحد بتاتولولین، به منظور ایجاد جهش انتخاب شد. با توجه به مطالعات انجام شده (۳)، موقعیت اسید آمینه ۲۶ در ژن *TUB2* مخمر، از گلیسین به اسیدآسپارتیک تغییر یافت. این مخمر موتانت، در سنجش کمی، کیفی تاکسول، در غربالگری‌ها برای پیدا کردن منابع جدید تولید کننده‌های تاکسول و متابولیت‌های ثانویه مختلف و استفاده‌های دیگر زیست فناوری می‌تواند به کار رود. هدف از این پژوهش، ایجاد سویه جهش یافته مخمر نانوائی است که نسبت به تاکسول حساس باشد.

### مواد و روش‌ها

الف) سویه مخمر و محیط کشت: برای جداسازی ژن *TUB2* و نیز ایجاد سویه جهش یافته از سویه مخمر YPH499 (*MATa ura3-52 lys2-801\_amber ade2-101\_ochre trp1-*) (*Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) استفاده گردید (۱۴).

سلول‌ها در محیط کشت جامد و یا مایع Synthetic Yeast Extract Peptone Complete (SC) Medium و یا YPD Dextrose (مرک، آلمان) بنا بر ضرورت کشت داده شدند (۱۵).

ب) طراحی آغازگرها: بر اساس داده‌های موجود در پایگاه داده ژنوم ساکارومیسس سروزیه *Saccharomyces Genome Database (SGD)*، آغازگرهای جداسازی ژن کامل *TUB2* طراحی گردید. همچنین برای ایجاد جهش در جایگاه اسید امینه

سرطان، با کمک سیستم‌های غربالگری زیستی عمومی و اختصاصی می‌تواند از راه کارهای مطمئن پیش‌رو باشد.

مکانیسم عملکرد تاکسول برای توقف تقسیم سلولی، در اتصال آن به زیر واحد بتا در توبولین‌ها و جلوگیری از تجزیه آن است که در نهایت موجب مرگ سلولی می‌گردد (۳). در گیاهان و جانوران، اعضای خانواده توبولین‌ها توالی‌های حفاظت شده اند و بیشترین تفاوت به انتهای کربوکسیلی زیر واحدهای آلفا و بتا مربوط است (۴) که در پاسخ به سیگنال‌های محیطی و نیز تنوع میکروتوبول‌ها نقش مهمی دارند. به علاوه نقش تفاوت‌های تک آمینواسیدی در اتصال تاکسول به زیر واحد بتا توبولین نشان داده شده است (۵). زیر واحدهای آلفا و بتا توبولین به عنوان مهمترین جز سازنده میکروتوبول‌ها در سلول‌های یوکاریوتی دارای بیش از یک ایزوتیپ یا ایزوفرم هستند (۶).

در شیزوساکارومیسس پومبه (*Schizosaccharomyces pombe*) و ساکارومیسس سروزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) دو ژن آلفا توبولین (*TUB1, TUB3*) و یک ژن بتاتوبولین (*TUB2*) وجود دارد (۷).

مخمر نانوائی ساکارومیسس سروزیه با قابلیت دست‌ورزی آسان و ژنتیک ساده، از دیرباز برای فهم فرآیندهای سلولی مورد استفاده بوده است (۸ و ۹). این قارچ تک سلولی با چرخه زندگی ۹۰ دقیقه‌ای دارای رشد و تکثیر کم‌هزینه و به هر دو صورت هاپلوئید و دیپلوئید پایدار است (۱۰). علاوه بر این‌ها، حداقل ۳۱٪ پروتئین‌های مخمر دارای ارتولوگ انسانی هستند و همچنین نزدیک ۵۰٪ ژن‌های عامل بیماری انسان، ارتولوگ مخمری دارند (۱۱). تغییر در فنوتیپ این موجود مدل، در پی حذف یک ژن یا چارچوب خوانش باز (ORF) از ژنوم، سبب شناسایی عملکرد ژن حذفی می‌شود. بنابراین تولید موتان‌های صفر (*null mutation*) یا ناکارا و به دنبال آن بررسی‌های فنوتیپی امکان دسته‌بندی ژن‌ها را بر اساس عملکرد فراهم می‌کند. چنین ویژگی موقعیتی استثنایی را برای مطالعه عملکرد ژن‌ها و اثر عوامل مختلف به ویژه مولکول‌های کوچک (سموم، داروها) بر عملکرد ژن‌ها فراهم می‌آورد. همچنین در مجموعه

جدول ۱: نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

| شماره | نام آغازگر     | ترادف                                 | هدف            |
|-------|----------------|---------------------------------------|----------------|
| ۱     | Y.2TU.M26-FWD3 | 5' ACT ATC TGT gat GAG CAC GGT TTG GA | ایجاد جهش      |
| ۲     | Y.2TU.M26-REV3 | 5' ACC GTG CTC atc ACA GAT AGT TT     | ایجاد جهش      |
| ۳     | Y.2TU.C-FWR    | 5' ATG AGA GAA ATC ATT CAT ATC TC     | همسانه‌سازی ژن |
| ۴     | Y.2TU.C-REV    | 5' TTA TTC AAA ATT CTC AGT GAT TG     | همسانه‌سازی ژن |

MgCl<sub>2</sub> (سیناکلون، ایران) انجام گرفت. به این ترتیب، با دمای واسرشتگی اولیه °C ۹۴ به مدت ۳ دقیقه، و در ادامه ۳۰ چرخه با دمای واسرشت °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، جفت شدگی به مدت ۴۵ ثانیه در °C ۵۵، گسترش °C ۶۸ به مدت ۹۰ ثانیه برای تکثیر ژن *TUB2* از ژنوم مخمر اعمال شد.

ه) ایجاد جهش نقطه ای در اسید آمینه ۲۶ از ژن *TUB2*: با استفاده از جفت آغازگرهای "Y.2TU M26-FWD3" و "Y.2TU C-FWR" و "Y.2TU C" و "Y.2TU M26-REV3" (جدول ۱) و شرایط واکنش زنجیره ای پلی مرز °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، °C ۴۳ به مدت ۴۵ ثانیه، °C ۶۸ به مدت ۷۰ ثانیه در ۳۰ چرخه همراه با دمای °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه قبل از چرخه نخست، با استفاده از آنزیم *Pfu* و در دو واکنش جداگانه، دو قطعه DNA از ژن *TUB2* مخمر به دست آمد. به مقدار ۰/۵ μl از محصولات واکنش‌های زنجیره ای پلی مرز ۱ و ۲ به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلی مرز ۳ با آغازگرهای Y.2tu.C-FWR و Y.2TU C (Sewing PCR) REV و شرایط چرخه‌ای مشابه (تنها تفاوت در افزایش زمان گسترش به مدت ۱۵۰ ثانیه) وارد شدند (شکل ۱).

محصول این واکنش با استفاده از کیت استخراج از ژل دانه‌های سیلیس (K0513-فرمنتاز، اکراین) از ژل آگاروز ۰/۰۸٪ تخلیص و در وکتور Clone JET™ (pJET1.2/blunt Cloning Vector) (سیناکلون- ایران) همسانه‌سازی و سازه حاصل با نام pJET-TUB2 ذخیره گردید. به منظور قرار گرفتن ژن *TUB2* در وکتور با استفاده از برش آنزیمی *EcoRV/PvuII* تایید گردید.

و) همسانه‌سازی ژن *TUB2* در وکتور بیانی مخمر: با استفاده از

۲۶ در *TUB2* مخمر نانویی از گلایسین به آسپارتیک اسید؛ GGT به GAT، طراحی آغازگرها انجام گرفت (جدول ۱).

ج) استخراج DNA از سویه مخمر: استخراج ژنوم از سویه مخمر هاپلوئید YPH499 به روش استفاده از پودر شیشه انجام گرفت. در این روش، یک کلنی از مخمر در ۵۰ ml محیط کشت YPD مایع تلقیح و با تکانه ۱۸۰ دور بر دقیقه در دمای °C ۳۰ گرماگذاری گردید. پس از رشدی معادل ۰/۵ در OD<sub>600</sub> سلول‌ها از محیط کشت جدا، با ۲۰ ml آب مقطر استریل شستشو و در ۱ ml آب مقطر سوسپانسیون گردیدند. به هر ۳۰۰ ml از این سوسپانسیون سلولی، ۲۰۰ μl محلول استخراج DNA (تریتون ۲x-100 درصد، SDS ۲ درصد، NaCl ۰/۱ مولار، BME ۲ درصد، EDTA ۰/۰۰۵ مولار با ۸ pH) (مرک-آلمان) و ۲۰۰ μl کلروفورم (مرک، آلمان) به همراه ۰/۳ gr خرده شیشه استریل اضافه و به شدت تکان داده شد. سپس به مخلوط ۲۰۰ μl بافر TE اضافه و در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. شستشو با ۵۰۰ μl کلروفورم و تخلیص با اتانول ۹۸٪ سرد و ۱۸ μl استات سدیم ۳ (مرک، آلمان) صورت گرفت. با استفاده از تیمار RNase A (فرمنتاز، اوکراین) به مدت یک ساعت در °C ۳۷ محتوی RNA در استخراج حذف گردید (۱۵).

د) جدا سازی ژن *TUB2* از مخمر نانویی: واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (دستگاه ترموسایکلر-آلمان) در حجم ۲۵ میکرولیتر و شامل ۱ واحد آنزیم *Pfu* با استفاده از آغازگرهای Y2TU.C-FWR و Y2T.C-REV با غلظت ۰/۲۲ میکرومولار از هر پرایمر (جدول ۱)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۱/۵۵ میلی‌مولار

سپس سلول‌ها رسوب داده شدند و ۱ ml محیط مایع Sc-URA با قند گلوکز به آن اضافه گردید و در رقت  $10^{-4}$  در پتری‌های جامد از Sc-URA با قند گلوکز پخش و به مدت ۴۸ ساعت در  $30^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور خالص سازی، تک کلنی‌های تراریخت حاصل یک بار دیگر بر روی محیط کشت مشابه به روش کشت چهار مرحله‌ای کشت داده شدند. تراریخته‌ها شماره‌گذاری و در ۲۵٪ غلظت نهایی گلیسرول و در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$ - ذخیره گردیدند.

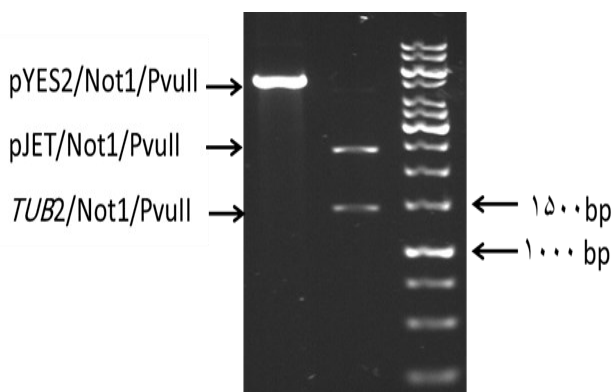
ح) ایجاد مخمر جهش‌یافته *TUB2-Asp<sup>26</sup>*: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که برای ایجاد جهش طراحی شده بودند (جدول ۱) واکنش زنجیره‌ای پلی مرز انجام گرفت. در ادامه محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز از ژن جهش‌یافته *TUB2-Asp<sup>26</sup>* به مخمر حاوی پلاسמיד pZF58 (*TUB2*) مخمر تحت پروموتور گالاکتوز) ترانسفورم گردید. به منظور القای بیان ژن توبولین وحشی، سلول‌ها بر روی محیط کشت Sc-URA تهیه شده با قند گالاکتوز، به مدت ۵ روز در  $30^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شدند. فرض بر این است که نیاز به زیرواحد توبولین ۲ از بیان این ژن از پلاسמיד pZF58 تامین می شود، ژن جهش‌یافته در ژنوم با کمک آنزیم ریکامیناز مخمر جایگزین ژن وحشی می گردد. ۸۴ کلنی از بین تمامی کلنی‌های تشکیل شده به صورت تصادفی انتخاب گردیدند.

کلنی‌های تراریخت در این مرحله برای غربالگری مورد استفاده قرار گرفتند. از کشت ۸۴ کلنی مخمر، در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی  $100\ \mu\text{l}$  محیط کشت YPD به عنوان کنترل و از همان کشت مخمر، به طور هم زمان در محیط کشت حاوی YPD و  $40\ \mu\text{M}$  تاکسول، تلقیح گردید. کشت‌ها هر دو ساعت از زمان صفر تا ۱۲ ساعت با اسپکتروفتومتری (دستگاه قرائت الیزا-بیوتک- آلمان) برای میزان کدورت در طول موج  $620\ \text{nm}$  بررسی شدند.

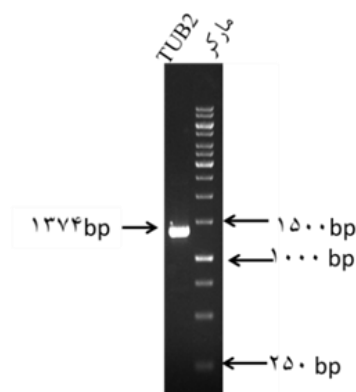
ط) تعیین *MBC* برای مخمر جهش‌یافته *TUB2-Asp<sup>26</sup>*: دو کلنی به دست آمده از مرحله اولیه غربالگری به نام های YNHA1 و YNHA2 برای تعیین *MBC* مورد استفاده قرار گرفتند. محلول مادر با غلظت  $25\ \text{mM}$  از تاکسول در DMSO

آنزیم‌های برشی (*Not I* (Fast digest, Cinna clone-Iran) و *PvuII* در دو مرحله جداگانه پلاسمید pJET-TUB2 و pYES2 برش صورت گرفت (۱۶). برای هر دو پلاسمید در مرحله اول با آنزیم *PvuII* برش انجام و بعد از استخراج از ژل، با آنزیم *Not I* ژن توبولین مخمر از پلاسמיד pJET-TUB2 جدا و نیز وکتور pYES2 برای زیر همسانه سازی آماده گردید. واکنش الحاق به مدت یک ساعت در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  و با کمک  $5\ \text{U}$  آنزیم *T<sub>4</sub> DNA ligase* (Cinna clone-Iran) یک شب در دمای  $16^{\circ}\text{C}$  انجام و در باکتری مستعد شده (*E. coli* (DH10B) وارد گردید. تراریخته‌های حاصل از pZF 58 بر روی محیط کشت Sc-URA تهیه شده با قند گلوکز، انتخاب و پس از تایید توالی‌یابی (MWG-آلمان) سازه مورد مطالعه، تراریخته ذخیره گردید. محیط *Sc* Synthetic complement medium (Sc) یک محیط کشت سنتزی است که مارکر انتخابی آن اوریدین است. این محیط کشت برای شناسایی اگزوتروف‌های آمینواسید کاربرد دارد.

ز) تراریخت سازی مخمر: تراریخت سازی مخمر به روش استات لیتیوم و شوک گرمایی انجام گرفت (۱۴). تک کلنی از مخمر در محیط کشت Sc-URA و در  $30^{\circ}\text{C}$  با دور ۱۸۰ در دقیقه تا رشد معادل  $OD_{600} 0.5$  گرم‌گذاری گردید. سلول‌ها با ۳ دقیقه سانتریفیوژ در  $5000\ \text{g}$  جدا و در ۱ ml از (محلول A با غلظت نهایی:  $0.1\ \text{M}$  Lit Acet pH7.5, 1XTE-buffer,  $0.1\ \mu\text{l}$  شستشو با محلول A، مجدداً در  $500\ \mu\text{l}$  از محلول A همگن گردیدند. برای هر واکنش تراریخت سازی، به  $100\ \mu\text{l}$  از این مخمرها  $5\ \mu\text{l}$  از DNA حامل (که از اسپرم شاه ماهی استخراج شده، و باید به خوبی در دمای حدود  $90^{\circ}\text{C}$  ذوب شود تا به صورت تک رشته ای در آید) و  $1\ \mu\text{g}$  از پلاسמיד pZF58 با یکدیگر مخلوط و  $700\ \mu\text{l}$  میکرولیتر از محلول B (محلول B با غلظت نهایی:  $0.1\ \text{M}$  Lit Acet pH 7.5, (Cinna-clone)+0.1 M Lit Acet pH 7.5, 1XTE-buffer, pH7.5 (40% (w/v) PEG4000) به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. تنش دمایی  $2^{\circ}\text{C}$  در حمام آب گرم به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت.



شکل ۲: زیر همسانه سازی ژن *TUB2* از پلاسمید (pJET) *TUB2* در پJET-*TUB2* وکتور بیانی pYES2.



شکل ۱: ژن *TUB2* حاصل از تکثیر ژنوم مخمر با آغازگرهای اختصاصی شماره‌های ۳ و ۴.

*TUB2* (شکل ۱) جداسازی و در وکتور pJE-T همسانه سازی شد.

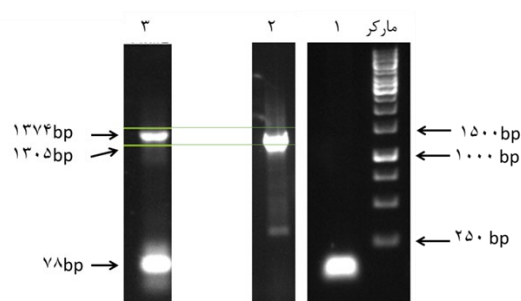
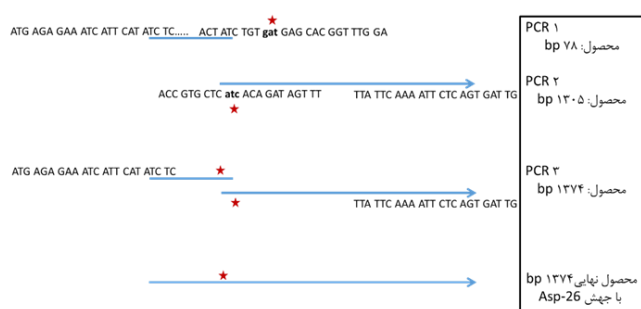
آنزیم های برش دهنده *EcoRV/PvuII* به منظور بررسی جهت صحیح قرار گرفتن ژن در وکتور pJE-T مورد استفاده قرار گرفت. به طوری که با برش آنزیم، قطعات ۱۳۰۳ و ۲۵۵۳ جفت بازی به دست آمد. پس از توالی یابی و تایید درستی توالی ژن *TUB2* (تشابه ۹۰٪ با توالی ژن *TUB2* ساکارومیسیس سرویزیه) زیر همسانه سازی در وکتور بیانی pYES2 صورت گرفت. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، اندازه ژن توبولین ۱۳۷۴ و وکتور pYES2 برابر با ۵۹۰۰ جفت باز است.

ب) ایجاد جهش نقطه ای *TUB2-Asp*<sup>26</sup>: با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در ایجاد جهش نقطه ای در اسید آمینه ۲۶ گلیسین *TUB2* در سه مرحله PCR انجام شد. نتایج در روی ژل آگاروز به شرح شکل ۳ قابل مشاهده است.

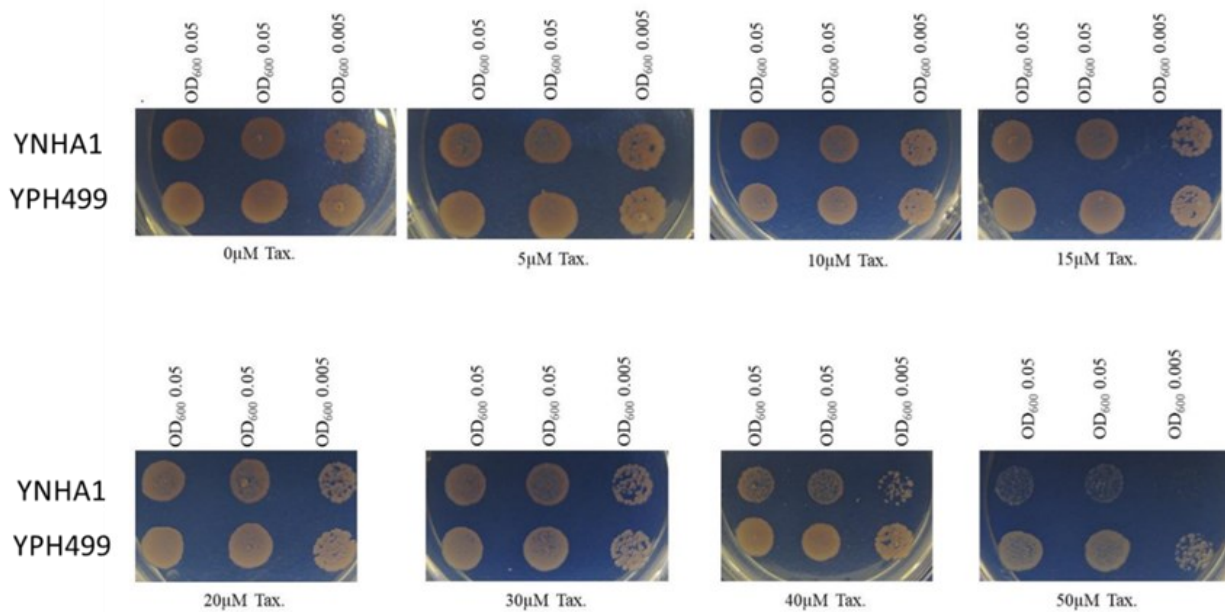
تهیه و غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میکرومولار در حجم ۲۰۰ μl با محیط کشت YPD به حجم نهایی ۲۰۰۰ μl رسید. این مقادیر در ویال های ۲ml با محیط کشت مخلوط و به پتری های ۳/۵cm منتقل شدند. مخمرهای تراریخت و وحشی در شرایط یکسان به مدت یک شب کشت و سپس وارد مرحله لگاریتمی رشد شدند. حجم معین ۱ μl از کشت‌ها با OD<sub>600</sub> ۰/۰۵ و OD<sub>600</sub> ۰/۰۵ بر روی محیط کشت با غلظت‌های معین تاکسول (شرح بالا) کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ °C گرمخانه گذاری گردیدند.

### یافته‌ها

الف) همسانه سازی ژن *TUB2* مخمر در وکتور pJE-T و زیر همسانه سازی در وکتور بیانی: قطعه DNA ۱۳۷۴ جفت بازی از ژنوم مخمر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن



شکل ۳: طراحی آغازگرها و نتایج واکنش‌های زنجیره ای پلی مرز برای ایجاد جهش در جایگاه اسید آمینه ۲۶ از *TUB2* مخمر از گلیسین (GGT) به آسپارتیک اسید (GAT). الف) طراحی آغازگرها، ستاره قرمز ایجاد جهش در محصول هر واکنش را نشان می دهد. ب) نتایج واکنش زنجیره ای پلی مرز؛ ستون ۱: محصول PCR1 قطعه ۷۸ جفت بازی ستون ۲: محصول PCR2 قطعه ۱۳۰۵ جفت بازی، ستون ۳: محصول نهایی قطعه ۱۳۷۴ جفت بازی در PCR3 (Sewing PCR).



شکل ۴: نتایج MBC سویه *YNHA1* (*TUB2-Asp<sup>26</sup>*) بر روی محیط کشت YPD حاوی تاکسول به مقادیر معین اشاره شده در شکل و در سه تکرار (دو تکرار با  $OD_{600}$  0.05 و یک تکرار  $OD_{600}$  0.005). با توجه به شکل MBC سویه *YNHA1* علیه تاکسول  $50 \mu M$  به دست آمد.

7-b-xylosyl-10-deacetyltaxol از 10-deacetyltransferase (ج) سنجش مقاومت مخمر جهش یافته به تاکسول: پس از انتقال ژن جهش یافته به مخمر، از ۸۴ کلنی که غربالگری آن‌ها برای رشد در  $40 \mu M$  میکرومولار تاکسول بررسی شد و در نهایت دو سویه مخمر رشد کردند. این مخمرها به نام *YNHA1* و *YNHA2* نام گذاری گردیدند. تکرار این آزمون نتایج مشابه با اولین غربالگری را در مورد *YNHA2* نشان نداد و این سویه حذف گردید. سویه *YNHA1* در آزمون بعدی در مقادیر ۵ تا  $50 \mu M$  میکرومولار در معرض تاکسول قرار گرفت. نسبت به سویه مادری حساسیت نسبت به تاکسول را در  $40 \mu M$  و  $50 \mu M$  نشان داد. نتایج در شکل ۴ به نمایش در آمده است. بنابراین، MBC سویه *YNHA1* علیه تاکسول  $50 \mu M$  به دست آمد.

7-b-xylosyl-10-deacetyltaxol را به سمت تولید تاکسول تغییر دادند (۱۷). با توجه به هزینه‌های زیاد آنالیزهای شیمیایی و تعداد پژوهش‌هایی که برای افزایش تولید تاکسول در حال انجام است، ایجاد یک سویه جهش یافته از مخمر (که به طور طبیعی به تاکسول مقاوم است) می‌تواند برای تعیین کمیت و کیفیت تاکسول کارایی داشته باشد. به علاوه، بررسی حساسیت سلول نسبت به ترکیبات دارویی و شناسایی مولکول‌های هدف آنها در موجود مدل یوکاریوتی مخمر، راهی برای آشکارسازی مکانیسم عملکرد آنها در سلول‌های انسان است. سویه‌های جهش یافته حساس به سموم با اثرات بازدارندگی رشد، می‌توانند به آسانی به وسیله مرگ یا رشد کند جهش یافته‌ها روی محیط دارای آن ترکیب خاص بررسی شوند. مطالعه حساسیت نسبت به بازدارنده میکروتوبول، بازدارنده ریبونوکلئوتید ردوکتاز، بازدارنده مسیر سیگنال فسفاتیدیل کیناز و ترکیبات ضد فارچ با استفاده از جهش یافته‌های حذفی مخمر نشان داد که بیان ژن‌های مقاومت به چندین دارو مانند *PDR5*, *SNQ1*, *YOR1* برای مقاومت علیه سموم و داروهای مختلف ضروری است (۱۱). مقاومت به این سم سلولی که به

پژوهشگران بوده است و پژوهشگران زیادی در این زمینه فعالیت می‌کنند. به عنوان نمونه، لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۱۸ با استفاده از آنالوگ 7-b-xylosyl-10-deacetyltaxol مقدار تولید را از حدود  $0.2\%$  درصد تا  $0.5\%$  درصد افزایش دادند. این گروه از محققین با ایجاد جهش، مسیر

## بحث

افزایش تولید تاکسول از منابع مختلف همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است و پژوهشگران زیادی در این زمینه فعالیت می‌کنند. به عنوان نمونه، لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۱۸ با استفاده از آنالوگ 7-b-xylosyl-10-deacetyltaxol مقدار تولید را از حدود  $0.2\%$  درصد تا  $0.5\%$  درصد افزایش دادند. این گروه از محققین با ایجاد جهش، مسیر

یافته است. امکان تغییر در بتا توبولین‌های سلول‌های توموری و به وجود آمدن ایزوتیپ‌هایی که امکان اتصال تاکسول را کم کرده باشد پیش بینی شده است (۱۹). همچنین با کمک پروتئین‌های جهش‌یافته BRCA1 و BRCA2 تغییر اثر تاکسان‌ها بر روی سلول‌های توموری نشان داده شده است. به طوری که می‌توان از این جهش‌ها به منظور تشخیص بیمارانی که به تاکسان‌ها مقاومت دارویی پیدا کرده‌اند، استفاده نمود (۲۳).

### نتیجه گیری

هدف از این آزمون به دست آوردن سویه (هایی) بود که در محیط معمولی رشد می‌کنند، اما در محیط حاوی تاکسول قادر به رشد نیستند. دو کلنی با این شرایط پیدا شدند که حاوی موتاسیون شماره ۳ از انتهای N ترمینال  $TUB2$  بودند. یکی از آنها در آزمون اولیه برای تحمل تاکسول در محیط مایع و در غلظت ۴۰ میکرومولار تاکسول رشدی کمتر را در مقایسه با شاهد که بدون تاکسول بود نشان داد. این مخمر YNHA1 نامیده شد. با توجه به هدف پژوهش، تحمل مقادیر بیشتر تاکسول در محیط می‌تواند به انتخاب ارگانسیم‌ها یا سلول‌های گیاهی که پتانسیل تولید تاکسول دارند، اما به دلیل مقدار تولید پایین از چرخه غربالگری حذف می‌شوند، کمک نماید.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل: عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی و در محل دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی گروه بیوتکنولوژی انجام شده است.

### تعارض در منافع

وجود ندارد.

عنوان داروی ضد سرطان به کار می‌رود، با بیش بیانی ژن PKC1 (Protein serine/threonine kinase) مخمر و چندین کیناز پایین دست دیگر ایجاد می‌شود (۱۰). محل پیوند مولکول‌های پاکلی تاکسل با بتا توبولین، اسیدهای آمینه  $Asp^{26}$ ،  $Val^{23}$ ،  $Lys^{19}$ ،  $His^{227}$  و  $Phe^{270}$  در بتا توبولین انسانی می‌باشد (۱۸). محل اتصال تاکسول و آنالوگ‌های آن بر میکروتوبول‌ها با نشاندارسازی تمایل نوری نیز تایید شده است (۱۹).

تغییر این آمینو اسیدها می‌تواند منجر به تغییر تمایل مولکول تاکسول در اتصال به زیر واحد  $TUB2$  گردد. مخمر نانوائی که به تاکسول مقاوم است، در موقعیت اسیدهای آمینه  $Gly^{26}$ ،  $Asn^{227}$ ،  $Tyr^{270}$ ،  $Thr^{23}$  و  $Ala^{19}$  در زیر واحد  $TUB2$  نسبت به بتا توبولین مغز انسان دارای تغییر است (۲۰). با تغییر اسیدهای آمینه ۲۳، ۲۶ و ۲۷۰ در سلول‌های مغز انسان به ترئونین، گلیسین و تیروزین نسبت به تاکسول مقاومت کاملی ایجاد شد، اما جهش‌های موقعیت ۱۹ و ۲۷۰ تقریباً بی‌تاثیر بوده‌اند (۳ و ۲۱).

در این پژوهش مخمر نانوائی برای ایجاد سیستم غربالگری برای مولکول تاکسول یا مولکول‌های دیگری که جایگاه اتصال مشابه تاکسول در میکروتوبول‌ها داشته باشند، مورد استفاده قرار گرفت. ایجاد جهش در موقعیت اسید آمینه ۲۶ در ژن  $TUB2$  مخمر از گلیسین به اسیدآسپارتیک در اولین مرحله مورد توجه قرار گرفت. اینوائسل (Entwistle) با هدف ایجاد جهش‌های مخمری، تاثیر هر یک از ۵ جایگاه آمینواسیدی توبولین در اتصال به مولکول تاکسول را بررسی نمود. در این مطالعه، مخمری با نقص در ترابره‌های غشایی (Strain AD 12345678 (AD1-8) MATa, PDR1)  $-3$ ،  $ura3$ ،  $pdr5::hisG$ ،  $pdr10::hisG$ ،  $pdr11::hisG$ ،  $(pdr3::hisG$ ،  $pdr15::hisG)$  که در ۴ جایگاه، آمینواسیدهای مشابه به توبولین مغز را داراست اما در جایگاه ۲۶ مشابه مخمر است، توانست  $25\mu M$  تاکسول را تحمل کند (۳ و ۲۲). در حالی که در پژوهش حاضر به دلیل استفاده از میزبان مخمر که در ترابره‌های غشایی خود نقصی ندارد، این مقدار تا ۲ برابر افزایش

## References

1. Majidi M. A review on taxol production through biotechnological approaches. *J Med Plant Res.* 2018; 4(68): 1-14.
2. Croteau R, Ketchum RE, Long RM, Kaspera R, Wildung MR. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev.* 2006; 5(1): 75-97.
3. Entwistle RA, Winefield RD, Foland TB, Lushington GH, Himes RH. The paclitaxel site in tubulin probed by site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -tubulin. *FEBS Lett.* 2008; 582(16): 2467-2470.
4. Fooladvand Z, Abolmaali S, Saidi A, Ashourion H. Characterization of  $\beta$ -tubulin cDNA (s) from *Catharanthus roseus*. *J Biodiver Environ Sci.* 2015; 6(1): 351-360.
5. Jost W, Baur A, Nick P, Reski R, Gorr G. A large plant beta-tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression. *Gene.* 2004; 340(1): 151-160.
6. Drukman S, Kavallaris M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents. *Int J Oncol.* 2002; 21(3): 621-628.
7. Adachi Y, Toda T, Niwa O, Yanagida M. Differential expressions of essential and nonessential alpha-tubulin genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 1986; 6(6): 2168-2178.
8. Castrillo JI, Oliver SG. Yeast as a touchstone in post-genomic research: strategies for integrative analysis in functional genomics. *BMB Rep.* 2004; 37(1): 93-106.
9. Replansky T, Koufopanou V, Greig D, Bell G. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends Ecol Evolut.* 2008; 23(9): 494-501.
10. Menacho-Marquez M, Murguia J. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9(4): 221-228.
11. Suter B, Auerbach D, Stagljar I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques.* 2006; 40(5): 625-644.
12. Stein A, Aloy P. A molecular interpretation of genetic interactions in yeast. *FEBS Lett.* 2008; 582(8): 1245-1250.
13. Akbari V, Moghim S, Mofid MR. Comparison of epothilone and taxol binding in yeast tubulin using molecular modeling. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2011; 3(4): 167.
14. Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology.* Elsevier; 2002. p. 87-96.
15. Sherman F. Getting started with yeast. *Methods in enzymology.* Elsevier; 1991. p. 3-21.
16. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989; 122(1): 19-27.
17. Li B-J, Wang H, Gong T, Chen J-J, Chen T-J, Yang J-L, et al. Improving 10-deacetylbaconin III-10- $\beta$ -O-acetyltransferase catalytic fitness for Taxol production. *Nat. Commun.* 2017;8:15544.



18. Gupta ML, Bode CJ, Georg GI, Himes RH. Understanding tubulin–Taxol interactions: mutations that impart Taxol binding to yeast tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(11): 6394-6397.
19. Yang C-P, Horwitz S. Taxol®: the first microtubule stabilizing agent. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(8): 1733.
20. Winefield RD, Entwistle RA, Foland TB, Lushington GH, Himes RH. Differences in paclitaxel and docetaxel interactions with tubulin detected by mutagenesis of yeast tubulin. *Chem Med Chem*. 2008; 3(12): 1844-1847.
21. Howes SC, Geyer EA, LaFrance B, Zhang R, Kellogg EH, Westermann S. Structural and functional differences between porcine brain and budding yeast microtubules. *Cell Cycle*. 2018; 17(3): 278-287.
22. Foland TB, Dentler WL, Suprenant KA, Gupta Jr ML, Himes RH. Paclitaxel-induced microtubule stabilization causes mitotic block and apoptotic-like cell death in a paclitaxel-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2005; 22(12): 971-978.
23. Nientiedt C, Heller M, Endris V, Volckmar A-L, Zschäbitz S, Tapia-Laliena MA. Mutations in BRCA2 and taxane resistance in prostate cancer. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 4574.



## Generation of taxol susceptible yeast strain by inducing mutation TUB2 -Asp<sup>26</sup>

Hamed Ashourion<sup>1</sup>, Shamsozoha Abolmaali<sup>2</sup>, Ziba Fooladvand<sup>1</sup>, Fatemeh Rezagholi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. student, Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. <sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Semnan University, Semnan, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Paclitaxel is an effective anti-microtubule agent against lung, ovarian and breast cancers. The low production of taxol in the yew, as well as its resistance to chemotherapy, is limiting the use of paclitaxel. This study aimed to create a screening system for new sources of taxol using the taxol sensitive mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

**Materials & Methods:** To mutate the yeast chromosome *TUB2* gene, primers containing a change in codon 26 from glycine to aspartic acid (GGT to GAT) were designed and TUB2-Asp<sup>26</sup> gene amplified by three-step PCR method. The TUB2 gene was then cloned from the haploid strain into the yeast expression vector in the galactose promoter. After transplantation of haploid yeast with Gal-TUB2 construct (pZF58), transgenic screening was carried out for the second time by PCR product of the TUB2-Asp<sup>26</sup> gene and in the medium containing galactose and against 40 μM taxol.

**Results:** Of the 84 transgenes, the yeast strain YNAH1 was selected from the first screening and the integration of mutation in the chromosome was confirmed by the MBC value of 50 μM taxol. The formerly generated membrane-defective yeast strain with amino acid sequences similar to the brain beta-tubulin with an exception for amino acid 26, tolerated 25 μM taxol. However, in the present study, tolerance increased by up to 2-fold due to the use of yeast hosts that had no defects in membrane transporters.

**Conclusion:** The mutant yeast strain can be used in screening to find new sources of taxol producers with production capacity up to 50 μM.

**Keywords:** Paclitaxel, Tubulin, *Saccharomyces cerevisiae*.

Correspondence to: Shamsozoha Abolmaali

Tel: +98 2331532293

E-mail: [s\\_abolmaali@semnan.ac.ir](mailto:s_abolmaali@semnan.ac.ir)

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 150-159.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.